

(3)

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-043147  
 (43)Date of publication of application : 14.02.1997

(51)Int.Cl. G01N 21/64

(21)Application number : 07-193130 (71)Applicant : BUNSHI BIO PHOTONICS  
 KENKYUSHO:KK

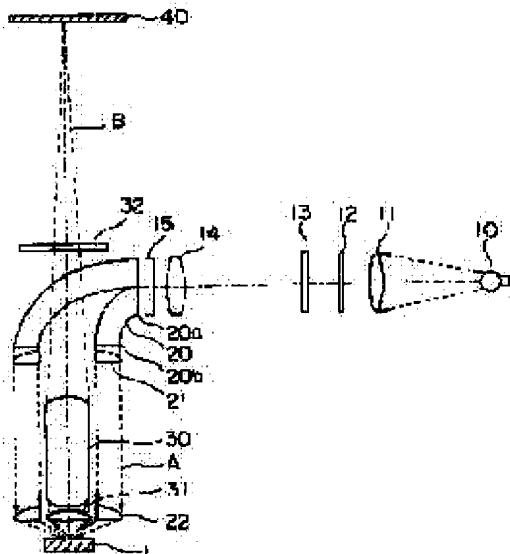
(22)Date of filing : 28.07.1995 (72)Inventor : TAMURA YUICHI

## (54) DARK-FIELD VERTICAL ILLUMINATING TYPE FLUORESCENCE MICROSCOPE DEVICE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a dark-field vertical illuminating fluorescence microscope device with which the quantity of fluorescence generated from a target fluorescent material contained in a sample can be measured or a fluorescent image generated from the fluorescent material can be observed with high sensitivity.

**SOLUTION:** A dark-field vertical illuminating type fluorescence microscope device is provided with a dark-field vertical illuminating means which emits exciting light upon a sample 1 without through an objective lens 30, but through the outside of the lens 30 and an absorption filter 31 which absorbs the exciting light component scattered by the surface of the sample 1, passes fluorescence generated from a fluorescent material contained in the sample 1, and is provided between the lenses constituting the objective lens 30 or on the sample 1 side of the lens 30 so that the microscope device can detect fluorescence with high sensitivity. The fluorescent material contained in the sample 1 is determined by irradiating the sample 1 with the exciting light by a quantity which is smaller than the saturated fluorescence intensity. Or, the image of fluorescence B emitted from the fluorescent sample 1 is observed by irradiating the sample 1 with such pulse-like exciting light that the average moving distance of the fluorescent material within the time of the pulse width is smaller than the resolution of the microscope.



1055090 (3)

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-43147

(43) 公開日 平成9年(1997)2月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 21/64

識別記号

府内整理番号

F I  
G 0 1 N 21/64

技術表示箇所  
E

審査請求 未請求 請求項の数26 O.L. (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平7-193130

(22) 出願日 平成7年(1995)7月28日

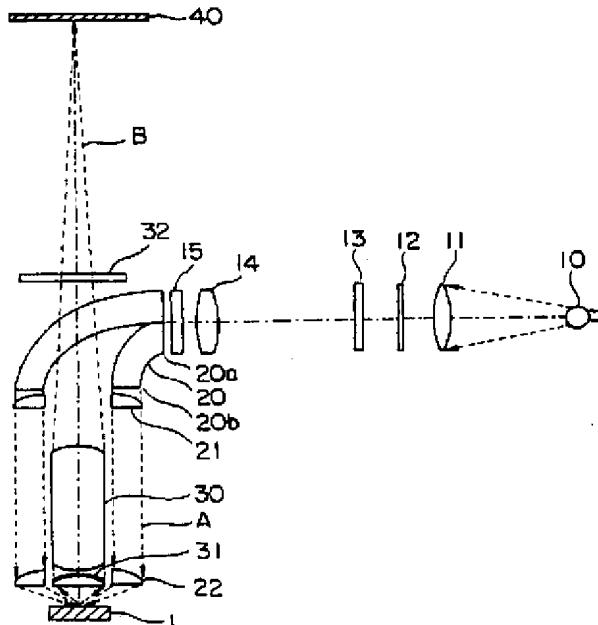
(71) 出願人 595047385  
株式会社分子バイオホトニクス研究所  
静岡県浜北市平口5000番地  
(72) 発明者 田村 雄一  
静岡県浜北市平口5000番地 株式会社分子  
バイオホトニクス研究所内  
(74) 代理人 弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

(54) 【発明の名称】 暗視野落射蛍光顕微鏡装置

(57) 【要約】

【目的】 試料中の目的の蛍光物質から発生する蛍光の光量測定あるいは蛍光像を高感度に観察することが可能な暗視野落射蛍光顕微鏡装置を提供することを目的とする。

【構成】 励起光が対物レンズを透過せず対物レンズの外部を経由して試料へ照射される暗視野落射照明手段を備えるとともに、試料表面から散乱される励起光成分を吸収し試料中の蛍光物質から発生した蛍光を透過させる吸収フィルタが対物レンズを構成する複数のレンズの間、又は、対物レンズの試料側に配される構成として、高感度の蛍光検出を可能とする。飽和蛍光強度よりも小さい光量の励起光を試料に照射させて、試料中の蛍光物質の定量測定をする。顕微鏡の分解能よりもそのパルス幅の時間内における蛍光物質の平均移動距離が小さいパルス状の励起光を試料に照射させて、蛍光試料から発せられる蛍光の像を観察する。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中の蛍光物質から発せられる蛍光を暗視野で観察する暗視野落射蛍光顕微鏡装置であって、前記試料に照射される励起光を発生する第1の光源部と、

前記第1の光源部から発せられた前記励起光を前記試料へ導き照射する暗視野落射照明手段と、

前記暗視野落射照明手段によって前記励起光が照射された前記試料の部分を視野に有し前記試料からの光を入力する第1の光学系と、前記第1の光学系から出力された光を入力し前記励起光の波長と略同一の波長の光を遮断する吸収フィルタと、前記吸収フィルタから出力された光を入力して所定領域に集光する第2の光学系とを有する対物レンズ部と、

前記対物レンズ部から出力された前記蛍光を検出する蛍光検出手段と、

を備えることを特徴とする暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 2】 前記第1の光源部は、前記励起光を前記試料にパルス状に照射させる手段を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 3】 前記第1の光源部は、前記試料に照射される前記励起光の光量を調整する手段を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 4】 前記暗視野落射照明手段は、

入射端で前記第1の光源部から出力された励起光を入力し、出射端が前記対物レンズ部の周囲に輪帯状に配された複数の光ファイバからなり輪帯光を出力する輪帯光ファイバ束と、

前記輪帯光ファイバ束の前記出射端から出力された前記輪帯光を集束して前記試料に照射させる輪帯レンズと、を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 5】 前記暗視野落射照明手段は、

円錐形状または円錐台形状の側面に形成された第1の反射鏡と前記第1の反射鏡に対面して配され円錐台内壁側面に形成された第2の反射鏡とを有し、前記第1の光源部から発せられた前記励起光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成鏡と、

前記輪帯光束形成鏡から出力された前記輪帯光を前記試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、

前記輪帯反射鏡から反射された前記輪帯光を集束して前記試料に照射させる輪帯レンズと、

を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 6】 前記暗視野落射照明手段は、

瞳位置または瞳の共役位置に配置され、円錐形状のプリズムと凹円錐形状のプリズムとを有し、前記第1の光源部から発せられた前記励起光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成プリズムと、

前記輪帯光束形成プリズムから出力された前記輪帯光を

2

前記試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、前記輪帯反射鏡から反射された前記輪帯光を集束して前記試料に照射させる輪帯レンズと、を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 7】 前記暗視野落射照明手段は、瞳位置または瞳の共役位置に配置され、反射又は透過の回折現象を利用した輪帯状の回折格子であって向かい合わせた第1の回折格子板と第2の回折格子板とを有し、前記第1の光源部から発せられた前記励起光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成回折格子と、

前記輪帯光束形成回折格子から出力された前記輪帯光を前記試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、前記輪帯反射鏡から反射された前記輪帯光を集束して前記試料に照射させる輪帯レンズと、を備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 8】 前記暗視野落射照明手段は、前記励起光が照射されても蛍光を発しない無蛍光材料で形成されることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 9】 前記第1の光学系には光学部品が配されないことを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 10】 前記吸収フィルタが前記第1の光学系の最終段の光学部品の表面に形成されることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 11】 前記吸収フィルタが前記第2の光学系の初段の光学部品の表面に形成されることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 12】 前記第1の光学系の最終段の光学部品が光の回折現象を利用するレンズであることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 13】 前記第2の光学系の初段の光学部品が光の回折現象を利用するレンズであることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 14】 前記第1の光学系が前記励起光が照射されても蛍光を発しない無蛍光材料で形成されることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 15】 前記第1の光源部から発せられる前記励起光を制御する処理制御手段を更に備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項 16】 前記第1の光源部から発せられる前記励起光の光量を測定する励起光検出手段を更に備え、前記処理制御手段は、前記励起光検出手段で測定された前記励起光の光量と前記蛍光検出手段で検出された前記蛍光とを処理するデータ処理部と、前記処理の結果に基づいて前記第1の光源部から発せられる前記励起光を制御する励起光制御部とを備える、ことを特徴とする請求項15記載の暗視野落射蛍光顕微

3

鏡装置。

【請求項17】 前記励起光検出手段は、前記第1の光源部から発せられた前記励起光の一部を入射端で入力し出射端から出力される光ファイバと、前記光ファイバの前記出射端から出力された前記励起光の一部の光量を測定する光検出器と、を備えることを特徴とする請求項16記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項18】 前記処理制御手段は、前記蛍光物質の飽和蛍光強度に比べて前記試料に照射される前記励起光の光量を小さく設定することを特徴とする請求項15記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項19】 前記処理制御手段は、前記試料中の前記蛍光物質の平均移動距離が前記蛍光検出手段における検出分解能より小さくなる時間を前記第1の光源部に指示し、前記第1の光源部は、前記処理制御手段から指示された前記時間のパルス幅を有するパルス状の励起光を発生する、ことを特徴とする請求項15記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項20】 前記第1の光源部は、パルス状の励起光を発生するとともに、前記蛍光検出手段は、前記パルス状の励起光のそれぞれのパルスが前記試料に照射された後の所定の時刻における前記試料からの光の光量を測定する蛍光検出遅延手段を備える、ことを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項21】 前記蛍光検出遅延手段は、前記第1の光源部から発せられた前記励起光の一部を反射させ、残部を前記暗視野落射照明手段の入射端に向けて透過させるビームスプリッタと、前記ビームスプリッタから反射された前記励起光の光量を測定し、前記第1の光源部が前記励起光を出力した時刻を検出して、励起光出力情報を出力する光検出器と、前記励起光出力情報を入力し、前記励起光が出力された時刻を基準にして所定の時間後から所定の時間幅の遅延情報を出力するディレイジェネレータと、前記蛍光物質から発生する蛍光の光路上に設けられ、前記遅延情報を入力し、前記遅延情報に基づいて前記所定の時間後から前記所定の時間幅の間だけ前記蛍光を透過させるゲート素子と、を備えることを特徴とする請求項20記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項22】 前記試料の表面に照射される操作光を出力する第2の光源部と、前記対物レンズ部と前記蛍光検出手段との間にあって、前記操作光を前記対物レンズ部の方向に反射させ、前記蛍光物質から発せられた蛍光を透過させる光分歧素子

4

と、を更に備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項23】 前記操作光を前記光分歧素子で反射させた後に前記対物レンズ部を透過させて前記試料の表面の所定の位置または範囲に照射させる光束操作手段を更に備えることを特徴とする請求項22記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項24】 前記第2の光源部から発せられ前記光分歧素子を透過した前記操作光の漏れ光を吸収する傾斜円錐内壁鏡を更に備えることを特徴とする請求項22記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項25】 前記試料の表面に照射され散乱されて前記対物レンズ部を透過した操作光を吸収し、前記蛍光物質から発せられた蛍光を透過させるフィルタを更に備えることを特徴とする請求項22記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

【請求項26】 前記試料に対して前記対物レンズ部の反対側に配され、前記試料を透過した光を吸収する傾斜円錐内壁鏡を更に備えることを特徴とする請求項1記載の暗視野落射蛍光顕微鏡装置。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、蛍光物質に励起光を照射してその蛍光物質から発せられた蛍光を暗視野で観察する暗視野落射蛍光顕微鏡装置に関するものである。

##### 【0002】

【従来の技術】 従来、蛍光物質を含む試料に励起光を照射して蛍光物質から発せられた蛍光を観察する蛍光顕微鏡として、落射蛍光顕微鏡、外部照明型の蛍光顕微鏡、暗視野透過蛍光顕微鏡、暗視野落射蛍光顕微鏡（「特開平3-266809」）、および走査型共焦点蛍光顕微鏡が知られている。

【0003】 落射蛍光顕微鏡では、光源から発せられた励起光は、励起フィルタを透過してダイクロイックミラーで反射され対物レンズの中を透過して試料に照射される。一方、試料中の蛍光物質から発せられた蛍光は対物レンズを通過しダイクロイックミラーと吸収フィルタを透過して観察部まで導かれる。尚、励起フィルタは、光源から発せられた光束の内の励起光成分を選択的に透過させる。ダイクロイックミラーは、励起光を反射させ蛍光を透過させる。吸収フィルタは、励起光を遮断し蛍光を透過させる。

【0004】 外部照明型の顕微鏡では、外部から励起光が試料に照射され、試料中の蛍光物質から発せられた蛍光は対物レンズと吸収フィルタを通過して観察部まで導かれる。

【0005】 走査型共焦点顕微鏡では、落射蛍光顕微鏡と同様に、光源から発せられた励起光は、励起フィルタ

5

を透過してダイクロイックミラーで反射され対物レンズの中を通過して試料に照射され、一方、試料中の蛍光物質から発せられた蛍光は対物レンズを通過しダイクロイックミラーと吸収フィルタを透過して観察部まで導かれる。ピンホールを用いることにより落射蛍光顕微鏡に比べて高コントラストの断層像の蛍光検出が可能である。

【0006】また、図16に示す「特開平3-266809」に開示されている暗視野落射蛍光顕微鏡では、光源から試料に到達するまでの光路は、試料中の蛍光物質から発せられた蛍光Bの光路と分離される。即ち、光源10から発せられた励起光成分を含む光束は、コレクターレンズ11とフィールドレンズ14で平行光束に形成され、励起フィルタ15で励起光が選択的に透過され、遮蔽板16で輪帶光Aに形成される。輪帶光Aは、ダイクロイックミラー17で反射され、対物レンズ30の外部を通って試料1に到達する。一方、試料1中の蛍光物質から発せられた蛍光Bは、対物レンズ30の内部を透過してダイクロイックミラー17と吸収フィルタ31を透過して観察部に向かう。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】落射蛍光顕微鏡では、観察部に到達する光は試料中の観察目的の蛍光物質から発生する蛍光だけではなく多種のノイズ光も存在する。図17は、従来の落射蛍光顕微鏡におけるノイズ光発生の説明図である。例えば、蛍光検出部40に到達するノイズ光として以下のものがある。励起フィルタ15は、光源10から発せられた光のうち励起光を選択的に透過させるが、その他の波長成分を完全には遮断できないので一部を透過させる。またダイクロイックミラー17は、励起フィルタ15から来た励起光を反射させるが、その反射は完全ではなく一部を漏れ光として透過させ、またダイクロイックミラー17においてノイズ蛍光を発生させる。またダイクロイックミラー17からの励起光が対物レンズ30を通過する際に、対物レンズ30においてノイズ蛍光が発生する。また試料1において観察目的の蛍光物質以外からノイズ蛍光が発生する。また試料1で散乱された励起光は再び対物レンズ30を透過するが、そこでもノイズ蛍光が発生する。また対物レンズ30から出力された励起光はダイクロイックミラー17で反射されるが、その反射は完全ではなく、またダイクロイックミラー17を透過した励起光は吸収フィルタ31で遮断されるが、その遮断も完全ではなく一部は透過して蛍光検出部40に到達する。また励起フィルタ15からの励起光の一部がダイクロイックミラー17を透過し、本顕微鏡の鏡筒壁33Aに照射されると、その鏡筒壁33Aにおいてノイズ蛍光が発生し、同時に励起光の一部は反射・散乱される。以上のようなノイズ蛍光、及び励起光の反射・散乱光や漏れ光は、試料1中の目的の蛍光物質から発生した蛍光と共に蛍光検出部40に到達するので、観察上のノイズとなり感度が低下するという

6

問題がある。特に、試料1中の蛍光物質の個数が少ない場合や蛍光率が小さい場合には、目的の蛍光物質から発生する蛍光の検出は不可能である。

【0008】外部照明型の顕微鏡では、試料表面で散乱された励起光、及びその散乱された励起光が対物レンズ等を透過する際に対物レンズ等から発生するノイズ蛍光が観察上のノイズとなる。また、開口数の大きな対物レンズの使用が困難で集光効率が低く低感度である。更に外部から励起光を試料に照射させる操作が煩雑であるという問題点もある。

【0009】走査型共焦点顕微鏡では、既に述べた落射蛍光顕微鏡が有する問題点に加えて、回折限界領域のみの照射のため、試料内の蛍光物質の探索に時間がかかることや蛍光物質がブラウン運動などをする場合に動きの様子を観察することが困難であるという問題点もある。

【0010】また図16に示した暗視野落射蛍光顕微鏡では、励起光が対物レンズを経由せず試料表面に到達するので、試料照射以前における対物レンズのノイズ光の発生は無くなる。しかし、光束の周辺部のみを利用してることや集光が困難で必要範囲より広く照明することなどにより暗くなる問題がある。またダイクロイックミラー17を漏れ光として透過した励起光が鏡筒内壁に照射されて発生するノイズ蛍光や、試料表面で散乱された励起光が対物レンズ等を透過する際に発生する蛍光が観察部に到達し、これらは観察上のノイズとなり感度低下の原因となるという問題点がある。

【0011】励起光として紫外光などの短波長がよく用いられるが、この場合には上記のようなノイズ（いわゆる自己蛍光といわれる光学系自信から発生するノイズ蛍光）は特に大きく、測定対象とする蛍光物質からの蛍光の測定は不可能である。

【0012】本発明は、上記問題点を解消するためになされたものであり、試料中の目的の蛍光物質から発生する蛍光の光量測定あるいは蛍光を高感度に観察することが可能な暗視野落射蛍光顕微鏡装置を提供することを目的とする。更には、蛍光物質の定量測定、動態観察、操作・処理も可能な暗視野落射蛍光顕微鏡装置を提供することをも目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】請求項1に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置は、試料中の蛍光物質から発せられる蛍光を暗視野で観察する暗視野落射蛍光顕微鏡装置であって、(1) 試料に照射される励起光を発生する第1の光源部と、(2) 第1の光源部から発せられた励起光を試料へ導き照射する暗視野落射照明手段と、(3) 暗視野落射照明手段によって励起光が照射された試料の部分を視野に有し試料からの光を入力する第1の光学系と、第1の光学系から出力された光を入力し励起光の波長と略同一の波長の光を遮断する吸収フィルタと、吸収フィルタから出力された光を入力して所定領域に集光する第

2の光学系とを有する対物レンズ部と、(4) 対物レンズ部から出力された蛍光を検出する蛍光検出手段と、を備えることを特徴とする。

【0014】第1の光源部から出力された励起光は、暗視野落射照明手段により、試料へ導かれて試料に向けて照射される。励起光が試料表面に照射されると、その試料中の蛍光物質から蛍光が発生し、その蛍光は、対物レンズの第1の光学系、吸収フィルタおよび第2の光学系をこの順に経由して集光される。蛍光検出手段は、対物レンズ部から出力された蛍光を検出する。尚、吸収フィルタは励起光の波長と略同一の波長の光を遮断する。

【0015】請求項2に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第1の光源部は、励起光を試料にパルス状に照射させる手段を備え、第1の光源部から出力されたパルス状の励起光が試料表面に照射される。

【0016】請求項3に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、試料に照射される励起光の光量を調整する手段を備え、第1の光源部から出力された所定光量の励起光が試料表面に照射される。

【0017】請求項4に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、暗視野落射照明手段は、(1) 入射端で第1の光源部から出力された励起光を入力し、出射端が対物レンズ部の周囲に輪帯状に配された複数の光ファイバからなり輪帯光を出力する輪帯光ファイバ束と、(2) 輪帯光ファイバ束の出射端から出力された輪帯光を集束して試料に照射させる輪帯レンズとを備える。輪帯ファイバ束の入射端に第1の光源部から出力された励起光が入力され、その出力端から輪帯レンズに向けて輪帯光が出力される。輪帯レンズは、その輪帯光を集束して試料に照射させる。

【0018】請求項5に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、暗視野落射照明手段は、(1) 円錐形状または円錐台形状の側面に形成された第1の反射鏡と第1の反射鏡に対面して配され円錐台内壁側面に形成された第2の反射鏡とを有し、第1の光源部から発せられた励起光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成鏡と、(2) 輪帯光束形成鏡から出力された輪帯光を試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、(3) 輪帯反射鏡から反射された輪帯光を集束して試料に照射させる輪帯レンズとを備える。第1の光源部から出力された励起光は、輪帯光束形成鏡の円錐形状または円錐台形状の側面に形成された第1の反射鏡で反射し、続いて第1の反射鏡に対面して配され円錐台内壁側面に形成された第2の反射鏡で反射して、輪帯反射鏡に向けて輪帯光として出力される。輪帯反射鏡はその輪帯光を輪帯レンズに向けて反射する。輪帯レンズは、その輪帯光を集束して試料に照射させる。

【0019】請求項6に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、暗視野落射照明手段は、(1) 瞳位置または瞳の共役位置に配置され、円錐形状のプリズムと凹円錐形状のプリズムとを有し、第1の光源部から発せられた励起

光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成プリズムと、

(2) 輪帯光束形成プリズムから出力された輪帯光を試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、(3) 輪帯反射鏡から反射された輪帯光を集束して試料に照射させる輪帯レンズと、を備える。第1の光源部から出力された励起光は、輪帯光束形成プリズムの凹円錐形状のプリズムで屈折され、続いて円錐形状のプリズムで屈折されて、輪帯反射鏡に向けて輪帯光として出力される。輪帯反射鏡はその輪帯光を輪帯レンズに向けて反射する。輪帯レンズは、その輪帯光を集束して試料に照射させる。

【0020】請求項7に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、暗視野落射照明手段は、(1) 瞳位置または瞳の共役位置に配置され、反射又は透過の回折現象を利用した輪帯状の回折格子であって向かい合わせた第1の回折格子板と第2の回折格子板とを有し、第1の光源部から発せられた励起光を入力し輪帯光を出力する輪帯光束形成回折格子と、(2) 輪帯光束形成回折格子から出力された輪帯光を試料に向けて反射させる輪帯反射鏡と、

(3) 輪帯反射鏡から反射された輪帯光を集束して試料に照射させる輪帯レンズと、を備える。第1の光源部から出力された励起光は、輪帯光束形成回折格子の第1の回折格子で回折され、続いて第2の回折格子で回折されて、輪帯反射鏡に向けて輪帯光として出力される。輪帯反射鏡はその輪帯光を輪帯レンズに向けて反射する。輪帯レンズは、その輪帯光を集束して試料に照射させる。

【0021】請求項8に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、暗視野落射照明手段は、励起光が照射されても蛍光を発しない無蛍光材料で形成される。この場合、暗視野落射照明手段を励起光が通過する際に蛍光が発生することはない、即ち、励起光が試料に照射される以前に蛍光が発生することはない。

【0022】請求項9に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第1の光学系には光学部品が配されない。請求項10に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、吸収フィルタが第1の最終段の光学部品の表面に形成される。請求項11に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、吸収フィルタが第2の光学系の初段の光学部品の表面に形成される。これらの場合、試料表面で散乱された励起光が吸収フィルタで吸収されるので第2の光学系での蛍光発生が著しく低減される。

【0023】請求項12に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第1の光学系の最終段の光学部品が光の回折現象を利用するレンズである。この場合、その最終段の光学部品はレンズ作用を果たすとともに励起光を吸収する。請求項13に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第2の光学系の初段の光学部品が光の回折現象を利用するレンズである。この場合、その初段の光学部品はレンズ作用を果たすとともに励起光を吸収する。

【0024】請求項14に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第1の光学系が励起光が照射されても蛍光を発

しない無蛍光材料で形成される。この場合、第1の光学系においても蛍光発生が抑制され、従って対物レンズ部全体における蛍光発生が抑制される。

【0025】請求項15に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第1の光源部から発せられる励起光を制御する制御処理手段を更に備える。この処理制御手段は、試料表面に照射される励起光の光量を制御したり、パルス状の励起光の時にはパルス幅やパルス周期を所定値に制御する。

【0026】請求項16に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、加えて、第1の光源部から発せられる励起光の光量を測定する励起光検出手段を更に備え、処理制御手段は、励起光検出手段で測定された励起光の光量と蛍光検出手段で検出された蛍光とを処理するデータ処理部と、処理の結果に基づいて第1の光源部から発せられる励起光を制御する励起光制御部とを備える。第1の光源部から発せられる励起光の光量、即ち試料表面に照射される励起光の光量は、励起光検出手段でモニタされる。励起光検出手段で測定された励起光の光量と蛍光検出手段で検出された蛍光とは、データ処理部で処理、例えば除算処理される。第1の光源部から発せられる励起光は、データ処理部における処理の結果に基づいて励起光制御部により制御される。

【0027】請求項17に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、励起光検出手段は、第1の光源部から発せられた励起光の一部を入射端で入力し出射端から出力させる光ファイバと、光ファイバの出射端から出力された励起光の一部の光量を測定する光検出器と、を備える。光ファイバの入射端に入力した第1の光源部から発せられた励起光の一部は、その出射端から出力され、その光量は、光検出器により測定され、励起光の光量がモニタされる。

【0028】請求項18に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、処理制御手段は、蛍光物質の飽和蛍光強度に比べて試料に照射される励起光の光量を小さく設定する。蛍光検出手段で測定される蛍光強度は、試料に照射される励起光の強度と試料中の蛍光物質の個数に比例するので、蛍光検出手段で測定される蛍光強度を基に試料中の蛍光物質の定量測定ができる。

【0029】請求項19に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、処理制御手段は、試料中の蛍光物質の平均移動距離が蛍光検出手段における検出分解能（顕微鏡の分解能）より小さくなる時間を第1の光源部に指示し、第1の光源部は、処理制御手段から指示された時間のパルス幅を有するパルス状の励起光を照射する。励起光の1パルス時間内における蛍光物質の移動距離は、蛍光検出手段の分解能よりも小さいので、蛍光検出手段がその1パルス時間内に蛍光を検出することにより鮮明な画像を得る。

【0030】請求項20に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装

置では、第1の光源部は、パルス状の励起光を発生するとともに、蛍光検出手段は、パルス状の励起光のそれぞれのパルスが試料に照射された後の所定の時刻における試料からの光の光量を測定する蛍光検出遅延手段を備える。パルス状の励起光のそれぞれのパルスが試料に照射された後の所定の時刻における試料からの光の光量が、蛍光検出手段により測定される。

【0031】請求項21に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、蛍光検出遅延手段は、(1) 第1の光源部から発せられた励起光の一部を反射させ、残部を暗視野落射照明手段の入射端に向けて透過させるビームスプリッタと、(2) ビームスプリッタから反射された励起光の光量を測定し、第1の光源部が励起光を出力した時刻を検出して、励起光出力情報を出力する光検出器と、(3) 励起光出力情報を入力し、励起光が出力された時刻を基準にして所定の時間後から所定の時間幅の遅延情報を出力するディレイジエレータと、(4) 蛍光物質から発生する蛍光の光路上に設けられ、遅延情報を入力し、遅延情報に基づいて所定の時間後から所定の時間幅の間だけ蛍光を透過させるゲート素子と、を備える。第1の光源から発せられた励起光の一部は、ビームスプリッタで反射され、その光量変化は光検出器によって測定される。ディレイジエレータは、その測定結果に基づいて、励起光が出力された時刻を基準にして、所定の時刻から所定の時間幅の遅延情報を出力し、ゲート素子は、その遅延情報を従ってゲートを開き、試料から発生した蛍光を透過させる。このようにして、蛍光検出手段は、試料表面に励起光パルスが照射された後の所定時刻における試料からの蛍光を検出する。ゲートの開閉時期及び開閉時間を制御することにより、試料表面に励起パルスが照射された後において試料からの光を蛍光検出手段が検出する時刻及び時間間隔を所定値に設定することができる。請求項22に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、(1) 試料の表面に照射される操作光を出力する第2の光源部と、(2) 対物レンズ部と蛍光検出手段との間にあって、操作光を対物レンズ部の方向に反射させ、蛍光物質から発せられた蛍光を透過させる光分岐素子と、を更に備える。第2の光源部から出力された操作光は、光分岐素子で反射され、対物レンズ部を透過して、試料の表面に照射される。同時に試料には暗視野落射照明装置により励起光が照射され、蛍光物質から蛍光が発生する。その蛍光は、対物レンズ部を透過し、光分岐素子を透過し、蛍光検出手段にて検出される。この時、操作光が照射された蛍光物質からの蛍光と操作光が照射されなかつた蛍光物質からの蛍光との差異などを観察する。

【0032】請求項23に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、加えて、操作光を光分岐素子で反射させた後に対物レンズ部を透過させて試料の表面の所定の位置または範囲に照射させる光束操作手段を更に備える。第2の

11

光源部から発せられた操作光は、光束操作手段により、光分岐素子で反射した後に対物レンズ部を透過して試料上の所定の位置または範囲に照射される。或いは、操作光が照射される試料上の位置または範囲は移動できる。この操作光の操作により試料中の特定物質を固定または移動させたりもする。

【0033】請求項24に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、第2の光源部から発せられ光分岐素子を透過した操作光の漏れ光を吸収する傾斜円錐内壁鏡を更に備える。傾斜円錐内壁鏡は、第2の光源部から発せられ光分岐素子を透過した操作光の漏れ光を吸収するので、蛍光検出手段にて検出される操作光の漏れ光の光量は僅かとなる。

【0034】請求項25に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、試料の表面に照射され散乱されて対物レンズ部を透過した操作光を吸収し、蛍光物質から発せられた蛍光を透過させるフィルタを更に備える。フィルタは、試料の表面に照射され散乱されて対物レンズ部を透過した操作光等を吸収するので、蛍光検出手段にて検出される操作光の散乱光の光量は僅かである。尚、フィルタは蛍光物質から発せられる蛍光を透過させて、蛍光検出手段はその蛍光を検出することができる。

【0035】請求項26に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、試料に対して対物レンズ部の反対側に配され、試料を透過した光を吸収する傾斜円錐内壁鏡を更に備える。この傾斜円錐内壁鏡は、試料を透過した光を吸収するので、蛍光検出手段にて検出される試料からの散乱光の光量は僅かとなる。

### 【0036】

【発明の実施の形態】以下、添付図面を参照して本発明の実施形態を詳細に説明する。尚、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

【0037】先ず、第1の実施形態について説明する。図1は、第1の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。図2は、第1の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

【0038】光源10は、試料1中の蛍光物質に蛍光Bを発生させるために照射される励起光の波長成分を含む光束を発生させる。光源10として、例えば水銀灯、ハロゲンランプ、キセノンランプ等が利用される。光源10から発生された光束は、コレクタレンズ11で略平行光に形成され、シャッタ12で透過／遮断の制御を受け、NDフィルタ13で透過時に適当に吸収されて試料1に照射される励起光の光量に調整され、フィールドレンズ14で輪帶光ファイバ束20の入射端20aに向けて集束される。励起フィルタ15は、輪帶光ファイバ束20の入射端20aの前面に配され、光源10から発せられた光束の内、励起光の波長成分を透過させる。従って、光源10から発せられた光束の内、励起光成分が輪

10

12

帶光ファイバ束20の入射端20aに入射される。

【0039】尚、光源10としてレーザ光源も利用可能である。また、蛍光測定の目的に応じて連続発振あるいはパルス発振が用いられる。光源10としてレーザ光源が用いられる場合に、レーザ光源から発せられた光束を太い平行光束に変換する必要があれば、コレクタレンズ11に替えてビームエキスパンダが使用される。励起光成分のみを発生する光源が用いられる場合には、励起フィルタ15は不要である。パルス幅やパルス周期を制御できる光源が用いられる場合には、シャッタ12は不要である。光量を調整することができる光源が用いられる場合には、NDフィルタ13は不要である。

【0040】本実施形態に係る暗視野落射照明手段は、輪帶光を形成する輪帶光ファイバ束20、輪帶光ファイバ束20から出射された輪帶光を略平行光に形成するコリメータレンズ21、および輪帶光を試料1表面上に集束させる輪帶コンデンサレンズ22を備える。

【0041】輪帶光ファイバ束20は、複数の光ファイバからなる。これらの複数のファイバの一端は束ねられて輪帶光ファイバ束20の入射端20aとなり、他端は本顕微鏡の鏡筒33の外部を取り巻いて輪帶状に配され輪帶光ファイバ束20の出射端20bとなる。励起フィルタ15を通過した励起光は、輪帶光ファイバ束20の入射端20aから入射し、輪帶光ファイバ束20の内部を導波し、輪帶光ファイバ束20の出射端20bから輪帶光として試料1方向に向けて出射される。

【0042】輪帶コリメータレンズ21は、鏡筒33の周囲、且つ輪帶光ファイバ束20の出射端20bの前面に配された輪帶状のレンズであり、輪帶光ファイバ束20から出射された輪帶光Aを略平行光に形成する。

【0043】輪帶コンデンサレンズ22は、鏡筒33の周囲に配された輪帶状のレンズであり、輪帶コリメータレンズ21から到達した輪帶光Aを試料1面上に集束し照射させる。

【0044】尚、輪帶光ファイバ束20を形成する個々の光ファイバとして、その出射端が球形状であつて平行光を出力する先球光ファイバを使用すれば、輪帶コリメータレンズ21を省略できる。また、輪帶光ファイバ束20、輪帶コリメータレンズ21および輪帶コンデンサレンズ22は、自己蛍光の少ない材料、例えば合成石英等で形成されるのが望ましい。

【0045】試料1は、例えば、微弱蛍光物質または標識蛍光分子を含む液体または細胞であり、或いは微弱蛍光物質を含む固体である。これら蛍光物質を含む試料1に励起光が照射されると、蛍光物質から蛍光Bが発生する。

【0046】対物レンズ30は、試料1表面上の励起光が照射された範囲の全てまたは一部をその視野とする。一般には複数のレンズの組で構成される。吸収フィルタ31は、対物レンズ30を構成する複数のレンズに挿ま

13

れた位置に配される。吸収フィルタ31および補助吸収フィルタ32は、試料1から反射してきた励起光成分を遮断し、蛍光Bを透過させる。尚、補助吸収フィルタ32は省略可能である。

【0047】従って、蛍光物質から発生した蛍光Bは、対物レンズ30、吸収フィルタ31および補助吸収フィルタ32を透過して蛍光検出部40に到達する。しかし、試料1表面で反射された励起光の一部は、吸収フィルタ31および補助吸収フィルタ32で吸収されるので、蛍光検出部40には到達しない。即ち、蛍光検出部40には蛍光成分のみが到達する。

【0048】対物レンズ30を構成するレンズは、自己蛍光の少ない材料で形成されるのが望ましい。特に吸収フィルタ31と試料1との間に存在するレンズは、自己蛍光の無い材料で形成されるのが望ましい。

【0049】尚、顕微鏡の鏡筒33は、対物レンズ30、吸収フィルタ31および補助吸収フィルタ32をその内部に含み、外部から励起光や外乱光が蛍光検出部40に到達しない構造に形成される。

【0050】蛍光検出部40は、蛍光検出部40に到達した蛍光Bを検出する。蛍光検出部40として例えば冷却CCDや光電子増倍管のような光子計数測定が可能な高感度の検出器が使用される。蛍光Bの像を撮像する場合には冷却CCDが用いられる。

【0051】本実施形態では、励起光が光源10から試料1に至るまでの光路と、試料1中の蛍光物質から発せられた蛍光Bが蛍光検出部40に至るまでの光路とが分離されるので、試料1に到達する以前の励起光が対物レンズ30等に蛍光を発生させることはない。更に、試料1で散乱された励起光を吸収する吸収フィルタ31が対物レンズ30の中間に配されるので、試料1から吸収フィルタ31に至るまでの光路上にある光学素子、即ち試料1で散乱された励起光が到達する光学素子が従来例と比較して少なく、従って試料1で散乱された励起光によるこれらの光学素子における蛍光の発生は少ない。従って、蛍光検出部40に到達する蛍光成分は、試料1から発せられた蛍光Bを高感度で検出する。

【0052】次に、第2の実施形態について説明する。本実施形態と第1の実施形態とは暗視野落射照明手段が異なる。図3は、第2の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。図4は、第2の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。図5は、第2の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部断面図である。

【0053】本実施形態に係る光源10から暗視野落射照明手段に至るまでの構成と作用、および試料1から蛍光検出部40に至るまでの構成と作用は、第1の実施形態と同様である。

【0054】本実施形態に係る暗視野照明手段は、輪帯光を形成する輪帯光束形成鏡24、その輪帯光を試料1

14

に向けて反射させる輪帯反射鏡23、および、輪帯コンデンサレンズ22を備える。

【0055】輪帯光束形成鏡24は、図5の断面図で示したように、円錐形状の側面に形成された反射鏡24Aとそれに対面する円錐台形状内壁の側面に形成された反射鏡24Bとかなる。入射端24aから入射した光束は、最初に円錐形状の側面に形成された反射鏡24Aで反射され、次に円錐台形状内壁の側面に形成された反射鏡24Bで反射され、出射端24bから輪帯光Aとして出射される。

【0056】輪帯反射鏡23は、鏡筒33の周囲に鏡筒33に対して斜めに配された輪帯状の反射鏡であり、輪帯光束形成鏡24で形成された輪帯光Aを、試料1の方向に向け反射させる。

【0057】鏡筒33は、輪帯光束形成鏡24から出力された輪帯光Aが輪帯反射鏡23に到達できるよう、輪帯光Aが通過する部分が透明あるいは途切れている。

【0058】輪帯コンデンサレンズ22は、対物レンズ30の周囲に配された輪帯状のレンズであり、輪帯反射鏡23から到達した輪帯光Aを試料1面上に集束し照射させる。

【0059】尚、輪帯光束形成鏡24、輪帯反射鏡23および輪帯コンデンサレンズ22は、自己蛍光の少ない材料、例えば合成石英などで形成されるのが望ましい。

【0060】次に、第3の実施形態について説明する。本実施形態と第1の実施形態とは暗視野落射照明手段が異なる。図6は、第3の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。図7は、第3の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図であり、図7(a)は断面図であり、図7(b)は斜視図であり、図7(c)は出力側から見た図面であり、図7(d)は入力側から見た図面である。

【0061】本実施形態に係る試料1から蛍光検出部40に至るまでの構成と作用は、第1の実施形態と同様である。

【0062】本実施形態に係る暗視野落射照明手段は、開口絞り80、輪帯光束形成プリズム27、視野絞り81、フィールドレンズ14、輪帯反射鏡23、および輪帯コンデンサレンズ22を備える。更に、本実施形態では、フライアイレンズ(インテグレータレンズ)18をも備える。

【0063】フライアイレンズ18は、均一な照明を行うため多数の棒状のレンズを束ねたものであり、その入射端はコレクタレンズ11の後段に配置される。開口絞り80は、試料1に照射される励起光を必要な明るさに制御する。また、開口絞り80と輪帯光束形成プリズム27の入射端は、フライアイレンズ18の直後の位置(瞳に共役な位置)に配置される。視野絞り81は試料1に共役な位置に配置され試料1表面上の必要部位のみに励起光照射を限定する。このような光学的配置によ

15

り、可変な開口絞りと視野絞りとを機能させ、必要十分な範囲と光量で最も効率的に試料1の励起を行い、低ノイズで高効率な目的蛍光物質の検出が可能となる。

【0064】輪帯光束形成プリズム27は、図7(a)の断面図で示したように、四円錐形状プリズム27Aとそれに対向する円錐形状のプリズム27Bとからなる。入射端27aから入射した光束は、最初に四円錐形状のプリズム27Aで屈折され、次に対向する円錐形状のプリズム27Bで屈折され、出射端27bから光束が縮小された輪帯光Aとして出射される。輪帯光束形成プリズム27は輪帯光束Aの幅と径を任意に設計することができる。輪帯光束形成プリズム27から出射された輪帯光Aは、光量を適量に減光するNDフィルタ13、必要な波長域のみを選択的に透過させる励起フィルタ15、及びフィールドレンズ14を透過し、輪帯反射鏡23に向けて出射される。

【0065】輪帯反射鏡23は、鏡筒33の周囲に鏡筒33に対して斜めに配された輪帯状の鏡であり、輪帯光Aを、試料1の方向に向けて反射させる。

【0066】鏡筒33は、輪帯光束形成プリズム27からの輪帯光Aが輪帯反射鏡23に到達できるよう、輪帯光Aが通過する部分が透明あるいは途切れている。

【0067】輪帯コンデンサレンズ22は、鏡筒33の周囲に配された輪帯状のレンズであり、輪帯反射鏡23から到達した輪帯光Aを試料1面上に集束し照射させる。

【0068】本実施形態では、試料1の下部に傾斜円錐内壁鏡73を設けている。試料1が透明である場合には、励起光の一部は試料1を透過するが、その透過した励起光は、傾斜円錐内壁鏡73の内壁で繰り返し反射される。更に、傾斜円錐内壁鏡73の頂点に到達した励起光は、その頂点に孔部を設けて接続された光ファイバ74に入射して、光ファイバ74を伝搬した後に光検出器75によって強度が測定される。これによって、試料1を透過した励起光の反射・散乱が除去され、測光される。更に、この測定値に基づいて、シャッタ12、NDフィルタ13および開口絞り80を制御することが可能であり、適正な励起光量と励起時間を設定することができる。

【0069】尚、フィールドレンズ14、輪帯反射鏡23および輪帯コンデンサレンズ22は、自己蛍光の少ない材料、例えば合成石英等で形成されるのが望ましい。

【0070】次に、第4の実施形態について説明する。図8は、第4の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。図9は、第4の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

【0071】本実施形態に係る暗視野落射照明手段は、開口絞り80、輪帯光束形成回折格子28、視野絞り81、フィールドレンズ14、輪帯反射鏡23、輪帯コンデンサレンズ22を備える。更に、本実施形態では、フ

10

16

ライアイレンズ(インテグレータレンズ)18、モニタ用ビームスプリッタ82、および励起光検出部42をも備える。

【0072】輪帯光束形成回折格子28は図9に示したように、断面形状が鋸歯状の輪帯格子からなる一対の反射又は透過型の回折現象を利用した光学部品であり、輪帯光束を形成することができる。図9(a)は、一対の反射型の回折現象を利用した輪帯光束形成回折格子の断面図であり、図9(b)は、その断面の形状を模式的に拡大して示した図である。この場合、入射端28aに入射した励起光は、一方の回折格子28Aの中央に設けられた孔部を通過して、他方の回折格子28Bで反射・回折される。その回折した励起光は、回折格子28Aで反射・回折されて、輪帯光Aとして出射端28bから出力される。図9(c)は、一対の透過型の回折現象を利用した輪帯光束形成回折格子の断面図であり、図9(d)は、その断面の形状を模式的に拡大して示した図である。この場合、入射端28aに入射した励起光は、一方の回折格子28Cの中央に設けられた格子部分で透過・回折され、その回折した励起光は、回折格子28Dで再び透過・回折されて、輪帯光Aとして出射端28bから出力される。

20

【0073】モニタ用ビームスプリッタ82は、励起光の一部(例えば0.1%)を反射し励起光検出部42に導き、その励起光の一部の光量は、励起光検出部42で測定される。この測定結果に基づいて、シャッタ12、NDフィルタ13および開口絞り80を制御することができる。

30

【0074】尚、光源10としてレーザを使用する場合は、コレクタレンズ11の代わりにビームエキスパンダを使用し、励起フィルタ15は不要である。またモニタ用ビームスプリッタ82、も蛍光の少ない材料で構成することが望ましい。

40

【0075】以上に述べた第2ないし第4の実施形態でも第1の実施形態と同様に、励起光が光源10から試料1に至るまでの光路が、試料1から発せられた蛍光Bが蛍光検出部40に至るまでの光路と分離されるので、試料1に到達する以前の励起光が対物レンズ30等において蛍光を発生させることはない。また、吸収フィルタ31に至るまでの光路上にある光学系において、試料1で反射された励起光による蛍光の発生は少ない。また、試料1で反射した励起光は吸収フィルタ31で遮断される。従って、蛍光検出部40は、試料1から発生された蛍光Bを高感度で検出する。

50

【0076】次に、吸収フィルタ31および対物レンズ30について更に詳しく説明する。図10は、本発明に係る対物レンズの一部断面図である。

【0077】図10(a)は、対物レンズ30の試料1側に、吸収フィルタ31が配された場合の断面図であ

17

る。対物レンズ30の開口数が小さい場合、即ち対物レンズ30と試料1との間に比較的距離をとることができの場合に有効である。吸収フィルタ31と試料1との間に光学素子が存在しないので、この間でノイズとなる蛍光は発生しない。

【0078】図10(b)は、対物レンズ30を構成する複数のレンズ30a、30bおよび30cの内の第3レンズ30cの試料1側の表面に、吸収フィルタ31が形成された場合の断面図である。この場合、第1レンズ30aおよび第2レンズ30bは無蛍光材料で形成されるのが望ましい。

【0079】図10(c)は、対物レンズ30を構成する複数のレンズ30a、30b、30cおよび30dの内の第3レンズ30cと第4レンズ30dとの間に、吸収フィルタ31が配された場合の断面図である。この場合、第1レンズ30aないし第3レンズ30cは無蛍光材料で形成されるのが望ましい。

【0080】図10(d)は、対物レンズ30を構成する複数のレンズ30a、30b、30cおよび30dの内の第3レンズ30cが光の回折現象を利用するレンズ(例えは、フレネルゾーンプレート、フレネルレンズ)であって、その第3レンズ30cの試料1側の表面に吸収フィルタ31が形成された場合の断面図である。この場合、第1レンズ30aと第2レンズ30bは無蛍光材料で形成されるのが望ましい。

【0081】その他、吸収フィルタ31および対物レンズ30の構成の様態には種々のものがあり得るが、試料1と吸収フィルタ31との間に存在する光学素子(対物レンズ30を構成するレンズ)が少ない程、また試料1と吸収フィルタ31との間に存在する光学素子から発生する蛍光が少ないほど、目的の蛍光物質以外から発生する蛍光の光量は少ない。

【0082】次に、以上の第1ないし第4の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置における試料1中の蛍光物質から発生する蛍光Bの光量の測定感度が、「特開平3-266809」に開示されている従来の暗視野落射蛍光顕微鏡の場合と比較して、如何に改善されるかについて説明する。尚、本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の吸収フィルタ31は図10(a)に示される位置\*

$$N = 1, Q = 1, \sigma = 10^{-20} [\text{m}^2] \quad \cdots (4)$$

とすると、

$$I_f = 10^{-12} \quad \cdots (5)$$

である。

【0087】従つて、従来の落射蛍光顕微鏡では、試料1中の蛍光物質から発生する蛍光Bの光量は、対物レンズから発生する蛍光の光量と比べて3桁も小さいので、検出困難である。これに対して、本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、試料1中の蛍光物質から発生する蛍光Bの光量は、対物レンズ30から発生する蛍光の光量と比べて2桁も大きいので、検出可能であることが

18

\*とする。即ち、吸収フィルタ31は対物レンズ30と試料1との間の位置に配されるとする。

【0083】両者ともに、試料1に照射される励起光は単位強度[単位は、lx、W/m<sup>2</sup>、またはphotons/(s·m<sup>2</sup>)など]であるとする。従来の落射蛍光顕微鏡における対物レンズの蛍光率(=蛍光光子数/励起光光子数)F0を10<sup>-5</sup>、本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置における対物レンズ30の蛍光率F1も10<sup>-5</sup>とする。吸収フィルタ31の消光比(=励起光エネルギー透過率/蛍光エネルギー透過率)γを10<sup>-5</sup>とする。散乱率(=試料1で散乱されて対物レンズ30の開口部に向かう励起光の光量/試料1に照射される励起光の光量)Rを10<sup>-4</sup>とする。尚、これらの値は現在入手可能なこれらの部品における典型的な値である。

【0084】これらの値を用いて計算すると、従来の落射蛍光顕微鏡の対物レンズから発生する蛍光は、  
 $F_0 \times R = 10^{-5} \times 10^{-4} = 10^{-9} \quad \cdots (1)$

である。本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置では、励起光の殆どが吸収フィルタ31で吸収され、吸収フィルタ31を透過して対物レンズ30の開口部に入射するのは僅かである。本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の対物レンズ30から発生する蛍光は、

$$F_1 \times \gamma \times R = 10^{-5} \times 10^{-5} \times 10^{-4} = 10^{-14} \quad \cdots (2)$$

である。

【0085】即ち、本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の対物レンズ30から発生する蛍光は、従来の落射蛍光顕微鏡の対物レンズから発生する蛍光と比べて5桁小さい。

【0086】一方、試料1の中の蛍光物質が希薄である場合には、試料1に照射される励起光を単位強度、蛍光物質の個数をN、蛍光物質の量子收率をQ、試料における励起光の吸収断面積をσ [m<sup>2</sup>]、顕微鏡の視野面積をS [m<sup>2</sup>]とすると、試料1中の蛍光物質から発生する蛍光Ifは、

$$I_f = N \times Q \times \sigma / S \quad \cdots (3)$$

なる式で表される(例えは、J.R.Lakowicz: Principles of Fluorescence Spectroscopy; Plenum Press, (1983)を参照)。ここで、典型的な値として、

$$N = 1, Q = 1, \sigma = 10^{-8} [\text{m}^2] \quad \cdots (4)$$

分かる。

【0088】また図10(b)ないし(d)に示される位置に吸収フィルタ31が配される場合でも、対物レンズ30から発生する蛍光の光量は、従来の落射蛍光顕微鏡における対物レンズから発生する蛍光の光量より少ない。特に吸収フィルタ31と試料1との間にある対物レンズ30を構成するレンズを無蛍光材料で形成すれば、更に対物レンズ30から発生する蛍光の光量は少ない。

【0089】次に、第5の実施形態について説明する。図11は、第5の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡

19

装置の構成断面図である。図12は、第5の実施形態に係る暗視野落射照明手段および励起光検出手段の一部構成図である。

【0090】本実施形態の構成では、第1の実施形態の構成に加えて、励起光の一部を取り出す励起光測定用ファイバ26、励起光の強度をモニタする励起光検出部42、励起光の強度やパルス形状を制御し蛍光強度の測定結果等を演算処理する処理制御部50、および処理制御部50で演算処理された結果を表示する表示部51が配される。

【0091】励起光測定用ファイバ26の入射端26aは、暗視野落射照明手段の一部である輪帯光ファイバ束20の入射端と共に束ねられて配され、光源10側から来た励起光の一部（例えば0.1%）を入射させる。

【0092】励起光検出部42は、励起光測定用ファイバ26の出射端26bから出射された光量を測定し、その測定値でもって試料1に照射される励起光の光量の指標とする。

【0093】尚、本実施形態においても、輪帯光ファイバ束20を形成する個々の光ファイバとして、その出射端が球形状であって平行光を出力する先球光ファイバを使用すれば、輪帯コリメータレンズ21を省略できる。また、輪帯光ファイバ束20、輪帯コリメータレンズ21および輪帯コンデンサレンズ22は、自己蛍光の少ない材料、例えば合成石英等で形成されるのが望ましい。

【0094】処理制御部50は、蛍光検出部40で測定された蛍光光量と励起光検出部42で測定された励起光光量とを演算処理、例えば両者の比を計算し、その処理\*

$$I_f = (N \times Q \times \sigma / S) \times I_i \times I_{fs} / (I_i + I_{fs}) \quad \dots (6)$$

なる式で表される（例えば、K. Visscher, G. J. Brakenhoff & T. D. Visser, (1994), Fluorescence saturation in confocal microscopy, Journal of Microscopy, Vol. 175, Pt. 2, pp. 162-165 を参照）。

【0098】ここで、試料1に照射される励起光の強度  $I_i$  と飽和蛍光強度  $I_{fs}$ との間に、

$$I_i / I_{fs} \quad \dots (7)$$

なる関係があれば、(6)式は、

$$I_f = (N \times Q \times \sigma / S) \times I_i \quad \dots (8)$$

となる。即ち、試料1に照射される励起光の強度  $I_i$  が飽和蛍光強度  $I_{fs}$ に比べて小さければ、試料1中の蛍光物質から発生する蛍光Bの強度  $I_f$  は、試料1に照射される励起光の強度  $I_i$  および試料1中の蛍光物質の個数  $N$ に比例する。

【0099】一方、蛍光検出部40における蛍光強度の測定を感度よく行うためには、試料1に照射される励起光の強度は大きいことが望ましい。しかし、試料1に照射される励起光の強度が増大すると、退色や消光が起こ

$$I_f = (N \times Q \times \sigma / S) \times (I_m / k_i) \quad \dots (8a)$$

と

$$I_m = k_i \times I_i \quad \dots (8b)$$

20

\*結果を表示部51に送り、表示部51はその処理結果を表示する。また処理制御部50は、光源10から発せられ試料1に照射される励起光の光量を制御して所定値に維持する。或いは、励起光パルスを発振させてそのパルス幅やパルス周期を制御して所定値に維持する。これらの制御に際しては、光源10やシャッタ12の動作を制御することにより行う。光源10が制御可能なパルス光源であれば、光源10に対して直接にパルス幅およびパルス周期を制御してもよい。励起光の光量の調節に際しては、NDフィルタ13を交換することにより行ってもよい。

【0095】また、励起光測定用ファイバ26に替えてビームスプリッタを用いて励起光の一部を反射させ、その反射された励起光を励起光検出部42で測定し、その測定値でもって試料1に照射される励起光の光量の指標とすることとしてもよい。

【0096】次に、本実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置を用いた蛍光物質の定量測定について説明する。

【0097】試料1に照射される励起光の強度がある一定値以上になると、試料1中にある蛍光物質から発生する蛍光Bの強度は飽和する。その飽和蛍光強度を  $I_{fs}$  とし、試料1に照射される励起光の強度を  $I_i$ 、試料1中の蛍光物質の個数を  $N$ 、蛍光物質の量子收率を  $Q$ 、試料における励起光の吸収断面積を  $\sigma$ 、顕微鏡の視野面積を  $S$  とすると、飽和を考慮した場合の蛍光Bの強度  $I_f$  は、

$$I_f = (N \times Q \times \sigma / S) \times I_i \times I_{fs} / (I_i + I_{fs}) \quad \dots (6)$$

り易くなる。

【0100】そこで、処理制御部50により、試料1に照射される励起光の強度  $I_i$  が、飽和強度  $I_{fs}$  に比べて小さく、且つ、退色や消光が起こらない程度に大きくなるように光源10から発せられる光束の強度を調整し、更に、処理制御部50により、蛍光検出部40で測定された蛍光強度を励起光検出部42で測定された励起光強度で除算すると、表示部51に表示されたその除算結果は試料1中の蛍光物質の量を表す。即ち、試料1中の蛍光物質の定量測定が可能となる。

【0101】尚、実際の測定では、試料への照射強度  $I_i$  を直接測定することが困難である。そこで、予め、既知の蛍光物質と条件 ( $N, Q, \sigma, S$ ) とを用いて、蛍光強度  $I_f$  と励起光検出部42で測定した照射モニタ強度  $I_m$  とが比例する環境下で、蛍光強度  $I_f$  と照射モニタ強度  $I_m$  とを測定する。そして、(8)式を変形した関係式

2J

とから、本顕微鏡装置に係る比例係数  $k_i$  を求める。以後、この比例係数を利用して蛍光と照射モニタ強度が比例する環境下で測定する。

【0102】次に、本実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置を用いた蛍光物質の動態観察について説明する。尚、ここでは、蛍光検出部40として、蛍光像を撮像可能な検出器、例えば冷却CCDを用いる。

【0103】試料1中で運動、例えばブラウン運動をする蛍光物質のシャープな蛍光画像を撮像するためには、蛍光検出部40は適正な撮像時間tで撮像する必要がある。即ち、撮像時間tの時間内における蛍光物質の運動の平均距離が顕微鏡の分解能以下である必要がある。試料1中の蛍光物質の拡散係数をDとすると、撮像時間tの時間内における蛍光物質の運動の平均距離(移動距離の自乗平均根)は、 $(2 \times D \times t)^{1/2}$ である。従って、顕微鏡の分解能をδとすると、鮮明な蛍光画像を撮像するための条件は、

$$(2 \times D \times t)^{1/2} < \delta \quad \dots (9)$$

即ち、

$$t < \delta^2 / (2 \times D) \quad \dots (10)$$

で表される。

【0104】尚、顕微鏡の分解能δは、顕微鏡の対物レンズの開口数NAおよび蛍光Bの波長λとから、

$$\delta \lambda / (2 \times NA) \quad \dots (11)$$

なる関係で決まる。また蛍光物質の拡散係数Dは、ボルツマン定数k、絶対温度T、蛍光物質の半径a、および試料1の粘性係数ηとから、

$$D = k \times T / (6 \times \pi \times a \times \eta) \quad \dots (12)$$

なる関係式で決まる(例えば、米沢富美子、「ブラウン運動」(1986年)、共立出版を参照)。

【0105】ここで、例えば典型的な値として試料1の粘性係数ηを $10^{-3}$ Pa·s、絶対温度Tを300K、顕微鏡の分解能δを200nm、ボルツマン定数kを $1.38 \times 10^{-23}$ J/Kとすると、蛍光物質の直径1nm、2nm、4nm、10nm、100nmに対して、それぞれ適正な撮像時間は、 $4.6 \times 10^{-5}$ 、 $9.1 \times 10^{-5}$ 、 $1.8 \times 10^{-4}$ 、 $4.6 \times 10^{-4}$ 、 $4.6 \times 10^{-3}$ 秒以下となる。

【0106】従って、処理制御部50により、シャッタ12が開いている時間が(10)式で表される時間以下となるようにシャッタ12の開閉を制御する。光源10が制御可能なパルス光源であれば、直接に光源10から発せられるパルス幅を制御する。また処理制御部50は、励起光検出部42で測定された励起光強度の時間変化から励起光のパルス幅を求め、その結果を励起光の制御にフィードバックする。蛍光検出部40は、試料1内の蛍光物質から発生した蛍光Bの像を撮像し、表示部51は、その蛍光像を表示する。

【0107】以上のようにすれば、表示部51上に表示される蛍光像としてシャープな画像が得られる。更に上記のような励起光パルスを繰り返し試料1に照射し、そ

のパルス毎に蛍光物質から発生する蛍光Bの像を撮像すれば、試料1中の蛍光物質の運動の様子を観察することができる。

【0108】尚、試料1に照射される励起光を、(7)式を満たす強度および(10)式を満たすパルス状のものとし、蛍光検出部40として例えば冷却CCDを用いて蛍光Bの光量と像を同時に測定すれば、試料1中の蛍光物質の定量測定と共に動態観測を同時にを行うことが可能である。

【0109】次に、第6の実施形態について説明する。図13は、第6の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【0110】本実施形態は、上述の第1ないし第4の実施形態に加えて、励起光検出部42、処理制御部50、表示部51、ビームスプリッタ60、光検出器61、ディレイジエネレータ62、ゲート素子63、およびリフレイレンズ64が配される。尚、この図では、光源10から暗視野落射照明手段を経て試料1に至るまでの光学系2、および試料1から対物レンズ30と吸収フィルタ31を経てゲート素子63に至るまでの光学系3を省略して記している。また暗視野落射照明手段は、第1ないし第4の実施形態において説明したいずれのものでも良い。

【0111】光源10から発せられたパルス励起光は、ビームスプリッタ60で大部分が透過し、光学系2を経由して、試料1中の蛍光物質を励起し蛍光を発生させる。ビームスプリッタ60で反射した僅かな励起光は、光検出器61で光量とその到達時刻が測定される。ディレイジエネレータ62は、光検出器61の測定データを受けて、励起光が光検出器61に到達した時刻を基準として、予め指定された時刻から予め指定された時間間隔だけゲートを開くようゲート素子63に指示を送る。

【0112】ゲート素子63は、ディレイジエネレータ62で指定された時刻から指定された時間間隔だけゲートを開き蛍光像を受光する。リフレイレンズ64はゲート素子63上に形成された蛍光像を蛍光検出部40に転送する。この様な方法によれば、十分に短いパルス励起光(例えばピコセカンド程度のパルス幅)で励起し、所定の遅延時間と時間間隔(例えば数ナノセカンド程度)だけの蛍光量を測定できる。尚、この遅延手段は上記の光検出器61とディレイジエネレータ62による電気的方法以外に光学的なビームスプリッタと可動反射鏡を使用し、ゲート素子63としてカーボン素子や可饱和吸収体等を利用しても良い。

【0113】本実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置を用いて、試料1中の目的の蛍光物質以外からも蛍光が発生し、その蛍光が目的の蛍光物質から発生する蛍光Bの寿命より短い場合における目的の蛍光物質からの蛍光Bの強度測定を以下のように行う。

【0114】目的の蛍光物質から発生する蛍光Bのピー

23

ク蛍光強度を  $I_s$  、蛍光寿命を  $\tau_s$  とする。また目的の蛍光物質以外から発生する蛍光のピーク蛍光強度を  $I_n$  、蛍光寿命を  $\tau_n$  とする。試料 1 にパルス状の励起光 \*

$$S/N = (I_s / I_n) \exp \{ - (1/\tau_s - 1/\tau_n) t \} \quad \dots (13)$$

で表される。ここで例えば、 $I_s / I_n = 0.1$  、 $\tau_s = 10\text{ns}$  、 $\tau_n = 1\text{ns}$  とすると、 $t \geq 2.6\text{ns}$  で SN 比は 1 以上になる。

【0115】従って、光源 10 からパルス励起光が発せられ、目的の蛍光物質から発生する蛍光 B の寿命が長いときには、ディレイジエネレイタ 62 を適切な遅延時間に設定して、ゲート素子 63 のシャッタ（ゲート）を開くことにより、目的物質からの蛍光 B の強度を蛍光検出部 40 で測定することができる。即ち、目的の蛍光物質からの蛍光 B の強度が、目的の蛍光物質以外からの蛍光強度よりも大きくなる時刻に、ディレイジエネレイタ 62 からの信号がゲート素子 63 に到達して指定された時刻及び時間間隔だけゲートが開き蛍光を透過させる。これにより、目的の蛍光物質からの蛍光 B は、ゲート素子 63 を透過し更にリレイレンズ 64 を透過し、蛍光検出部 40 に到達してその蛍光像が撮像される。処理制御部 50 は、蛍光検出部 40 で撮像された蛍光像を励起光検出部 42 で測定された励起光強度で除算し、表示部 51 はその結果を表示する。

【0116】更に、本実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置によれば、蛍光検出部 40 に到達し得る光束が試料 1 中の蛍光物質から発生する蛍光 B のみである場合には、試料 1 に照射される励起光のパルス毎にゲート素子 63 のゲートを開く時刻を変化させて、ゲート素子 63 を透過した蛍光 B の強度を蛍光検出部 40 で撮像することにより、励起光パルス後の各時刻における蛍光像を撮像することが出来、従って蛍光寿命分布を測定することができる。

【0117】次に、第 7 の実施形態について説明する。図 14 は、第 7 の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。図 15 は、傾斜円錐内壁鏡の断面図である。

【0118】本実施形態の構成では、第 1 の実施形態の構成に加えて、励起光測定用ファイバ 26 、励起光検出部 42 、処理制御部 50 、表示部 51 、試料 1 表面上に照射される操作光を発生する操作光源 70 、試料 1 上面上の操作光照射位置を操作する操作光東操作部 71 、操作光を反射させ蛍光 B を透過させる光分岐素子 17 、操作光を遮断し蛍光成分を透過させるフィルタ 64 、操作光を吸収し反射させない傾斜円錐内壁鏡 72 、73 が配される。光分岐素子 17 として、例えば、ダイクロイックミラーや偏光ビームスプリッタが用いられる。ダイクロイックミラーが用いられる場合には、光の波長に依って透過・反射が選択され、偏光ビームスプリッタが用いられる場合には、光の偏光方向に依って透過・反射が選択される。

24

\*が照射された時点を基準とした時刻を  $t$  とすると、SN 比は、

$$S/N = (I_s / I_n) \exp \{ - (1/\tau_s - 1/\tau_n) t \} \quad \dots (13)$$

【0119】光源 10 から発せられた励起光は、コレクタレンズ 11 、シャッタ 12 、ND フィルタ 13 、フィールドレンズ 14 、励起フィルタ 15 、輪帯光ファイバ 束 20 、輪帯コリメータレンズ 21 、および輪帯コンデンサレンズ 22 を経由して試料 1 表面に照射される。試料 1 から発せられた蛍光 B の像は、対物レンズ 30 、吸収フィルタ 31 、光分岐素子 17 、およびフィルタ 64 を透過して、蛍光検出部 40 で撮像され表示部 51 に表示される。

【0120】一方、操作光源 70 は、例えば、レーザ光源であり、長波長の操作光（レーザ光）を発生する。このため光学系の自己蛍光は殆ど発生しない。この操作光は、操作光束操作部 71 を経由し、光分岐素子 17 で反射され、対物レンズ 30 と吸収フィルタ 31 を透過して、試料 1 表面上に照射される。操作光束操作部 71 は、操作光が照射される試料 1 表面上の位置等を操作する。操作光が試料 1 表面上に照射されると、その照射された範囲の試料 1 内の蛍光物質の特性は変化を受ける。蛍光物質から発生した蛍光 B の像を蛍光検出部 40 で撮像し表示部 51 で観察することにより、操作光が照射された蛍光物質の挙動と操作光が照射されなかった蛍光物質の挙動とを比較することができる。即ち、蛍光物質の平均的な情報だけでなく、微環境下での個々の蛍光物質の挙動を観察できる。

【0121】尚、操作光束操作部 71 を経由した後の操作光の一部は、光分岐素子 17 を漏れ光として透過し、傾斜円錐内壁鏡 72 に到達する。傾斜円錐内壁鏡 72 に入射した漏れ光は、その傾斜円錐内壁で殆どが吸収され一部が反射される。しかし、その反射された一部漏れ光も再び傾斜円錐内壁で殆どが吸収される。傾斜円錐内壁鏡 72 はこれを繰り返す。従って、傾斜円錐内壁鏡 72 は光分岐素子 17 からの漏れ光の大部分を吸収し、傾斜円錐内壁鏡 72 で散乱され光分岐素子 17 裏面で反射されて蛍光検出部 40 に向かう操作光の漏れ光は極めて少ない。同様に、試料 1 の下部にも傾斜円錐内壁鏡 73 が設けられ、試料 1 が透明試料である場合には、試料 1 に照射され透過した励起光および操作光の殆どは、その傾斜円錐内壁鏡 73 に到達し吸収される。従って、試料 1 を透過して、傾斜円錐内壁鏡 73 で反射し、蛍光検出部 40 に向かう散乱光は極めて少ない。具体例として例えば、斜入射で吸収率を 9.0% 、反射率を 1.0% とするとき、10 回反射では  $10^{-10}$  に減衰し、单一吸収面への直入射で吸収率 9.9% 、9.9% (反射率 0.01%) と比較しても、 $10^{-6}$  倍に反射ノイズが減少する。

【0122】これら傾斜円錐内壁鏡 72 、73 は、図 15 (a) に示すように、その表面に円錐内壁形状が傾斜

25

して形成されてもよいし、図15 (b) に示すように、円錐の軸が曲線状である円錐内壁形状であってもよいし、また、図15 (c) に示すように、円筒形状と傾斜円錐内壁の組み合わせ構造であってもよい。更に、円錐内壁の頂点に孔部を設けて光ファイバ74を接続して円錐内壁頂点に達した光を外部に取り出し、その光を廃棄してもよいし、或いは、その光の光量を光検出器75でモニタしてもよい。また、円筒が長くなつて問題となる場合には、反射鏡で光路を曲げた後に光が傾斜円錐内壁鏡に到達するようにしてもよい。

【0123】更に、フィルタ64は、傾斜円錐内壁鏡72で吸収されずに散乱され光分岐素子17裏面で反射されて蛍光検出部40に向かう操作光、および試料1で反射され対物レンズ30と吸収フィルタ31を透過して光分岐素子17を漏れ光として透過する操作光の大部分を吸収する。従つて、フィルタ64を透過して蛍光検出部40に到達する操作光はきわめて少なく、蛍光検出部に送る感度低下の原因とはならない。

【0124】尚、本実施形態における操作光はレーザ光に限定されるものでなく、任意の光源を使用してもかまわない。また、例えば、パルスレーザにて光の回折限界まで集光して2光子励起による蛍光や2光子励起によるケージド物質の光分解などに使用しても良い。また、本発明に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置とスペクトル分析器とを組み合わせて使用すれば、試料1から発生した蛍光のスペクトルを高感度に解析できる。偏光解析器と組み合わせて使用すれば、試料1から発生した蛍光の偏光状態を高感度に解析できる。

【0125】以上説明したように、試料1中の蛍光物質から発生する蛍光の寿命、スペクトル、偏光等を感度良く解析することができ、また試料1中における蛍光物質の運動の様子を観察することができるので、試料1中の蛍光物質の同定、更には診断など応用することができる。

【0126】本発明は、上記実施形態に限定されるものではなく、種々の変形が可能である。例えば、吸収フィルタが配される位置は、図10 (a) ないし (d) に配された位置に限られるものでなく、対物レンズを構成するレンズ群の間の任意の位置に配されても構わない。

【0127】

【発明の効果】以上、詳細に説明したとおり本発明によれば、励起光が対物レンズを透過せず対物レンズの外部を経由して試料へ照射される暗視野落射照明手段を備えるとともに、試料表面から散乱される励起光成分を吸収し試料中の蛍光物質から発生した蛍光を透過させる吸収フィルタが対物レンズを構成する複数のレンズの間、または、対物レンズの試料側に配される構成としたので、試料中の蛍光物質以外からの蛍光の発生を抑制し、高感度の蛍光検出が可能となり、更には単一蛍光分子からの蛍光の検出も可能である。

10

26

【0128】特に、励起光が紫外光などの短波長である場合には光学素子に励起光が照射されると蛍光が発生しやすいが、この場合にも高感度の蛍光検出が可能となる。

【0129】また、高感度の蛍光検出が可能となるのに伴い、飽和蛍光強度よりも小さい光量の励起光を試料に照射させることにより、試料中の蛍光物質の定量測定也可能となる。

【0130】また、顕微鏡の分解能よりもそのパルス幅の時間内における蛍光物質の平均移動距離が小さいパルス状の励起光を試料に照射させることにより、非固定の蛍光試料から発せられる蛍光の像の観察が可能となる。更に、パルス状励起光を試料に連続して照射させ、パルス毎に蛍光試料から発せられる蛍光の像を撮像すれば、蛍光物質の動態観察も可能となる。

【0131】また、試料中の蛍光物質から発生する蛍光が蛍光検出部に至るまでの光路上にゲート素子を設け、励起光発生時刻から所定の時間後に所定の時間幅だけそのゲート素子のゲートを開くことにより、目的の蛍光物質から発生する蛍光の寿命が目的の蛍光物質以外から発生する蛍光の寿命に比べて長い場合には、その寿命差を利用して目的の蛍光物質からの蛍光を選択的に測定することが可能となる。即ち、パルス状の励起光を試料に照射させた後に、目的の蛍光物質以外から発生する蛍光の強度より目的の蛍光物質から発生する蛍光の強度が大きい時刻に、試料からの蛍光の強度を測定することにより、目的の蛍光物質からの蛍光を選択的に測定することが可能となる。また励起光パルス照射後の各時刻における蛍光強度を測定することにより、蛍光寿命を測定することができる。

20

【0132】また、励起光とは別に操作光を試料に照射させて試料中の蛍光物質の特性を変化させ、試料中の蛍光物質から発生する蛍光の像を撮像することにより、操作光が照射された蛍光物質の挙動と操作光が照射されなかつた蛍光物質の挙動とを比較することができる。即ち、蛍光物質の平均的な情報だけでなく、微環境下での個々の蛍光物質の挙動の観察が可能となる。

【0133】更には、蛍光物質の同定や診断への応用も可能となる。

40

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】第1の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図2】第1の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

【図3】第2の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図4】第2の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図5】第2の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

50

27

【図6】第3の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図7】第3の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

【図8】第4の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図9】第4の実施形態に係る暗視野落射照明手段の一部構成図である。

【図10】本発明に係る対物レンズ部の一部断面図である。

【図11】第5の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図12】第5の実施形態に係る暗視野落射照明手段及び励起光検出手段の一部構成図である。

【図13】第6の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図14】第7の実施形態に係る暗視野落射蛍光顕微鏡装置の構成断面図である。

【図15】傾斜円錐内壁鏡の断面図である。

【図16】従来の暗視野落射蛍光顕微鏡の断面図であ

28

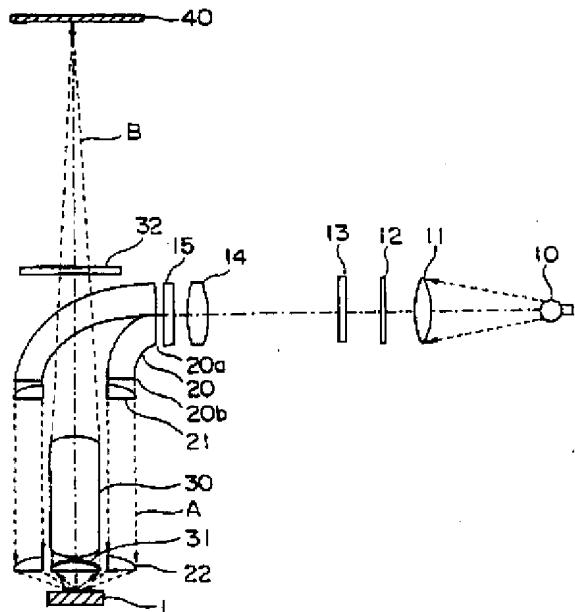
る。

【図17】従来の落射蛍光顕微鏡装置におけるノイズ光発生の説明図である。

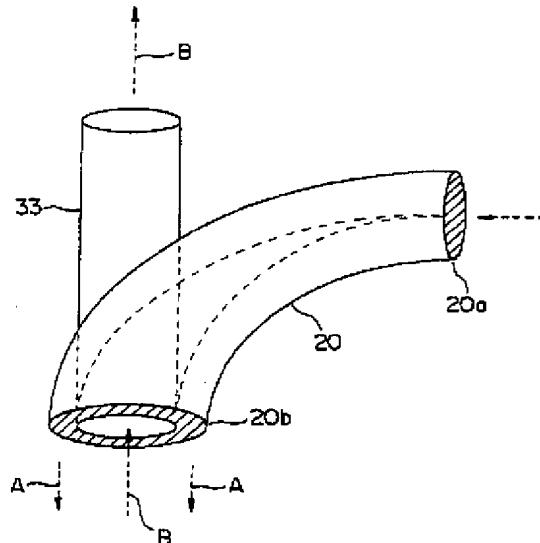
【符号の説明】

1…試料、10…光源、11…コレクタレンズ、12…シャッタ、13…NDフィルタ、14…フィールドレンズ、15…励起フィルタ、16…遮蔽板、17…光分岐素子、18…ライアイレンズ、20…輪帶光ファイバ束、21…輪帶コリメータレンズ、22…輪帶コンデンサレンズ、23…輪帶反射鏡、24…輪帶光束形成鏡、26…励起光測定用ファイバ、27…輪帶光束形成プリズム、28…輪帶光束形成回折格子、30…対物レンズ、31…吸収フィルタ、32…補助吸収フィルタ、33…鏡筒、40…ビームスプリッタ、61…光検出器、62…ディレイジエレータ、63…ゲート素子、64…リレイレンズ、70…操作光源、71…操作光束操作部、72、73…傾斜円錐内壁鏡、74…光ファイバ、75…光検出器、A…輪帶光、B…蛍光。

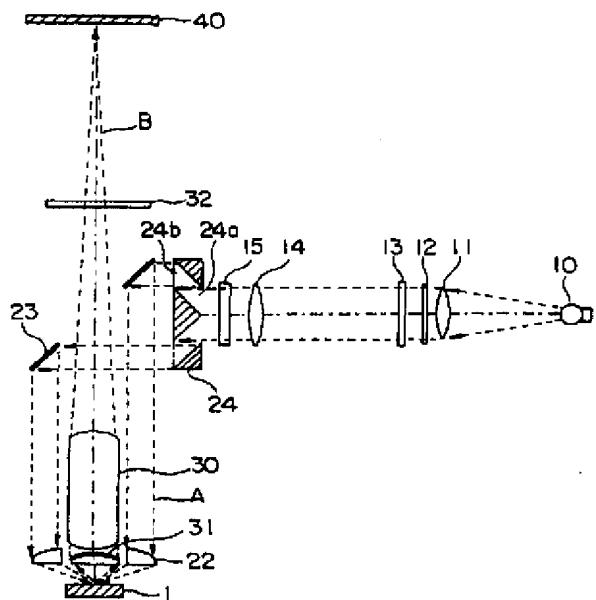
【図1】



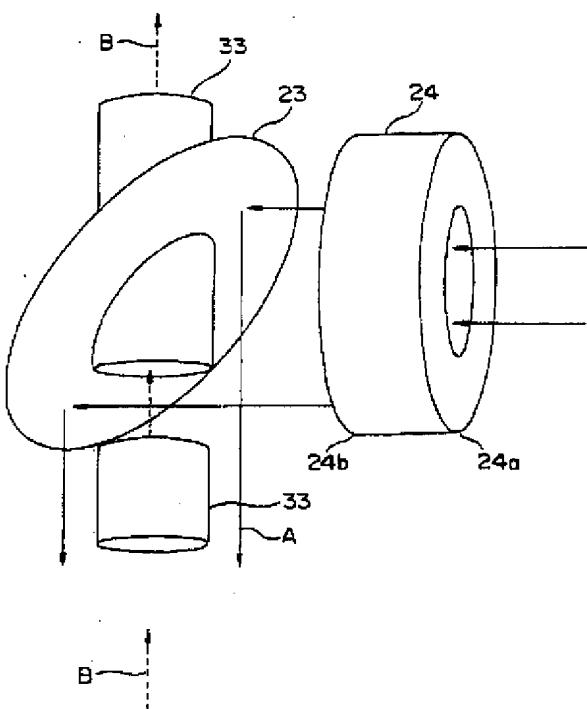
【図2】



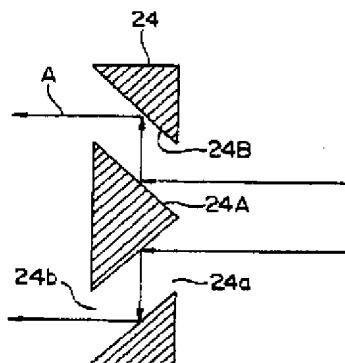
【図3】



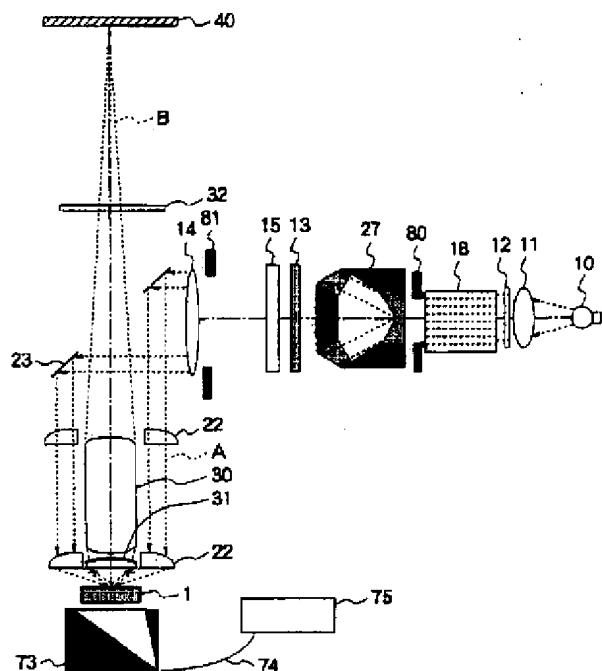
【図4】



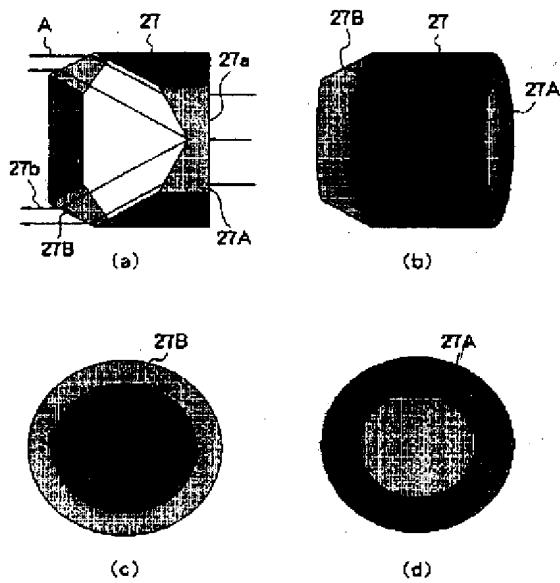
【図5】



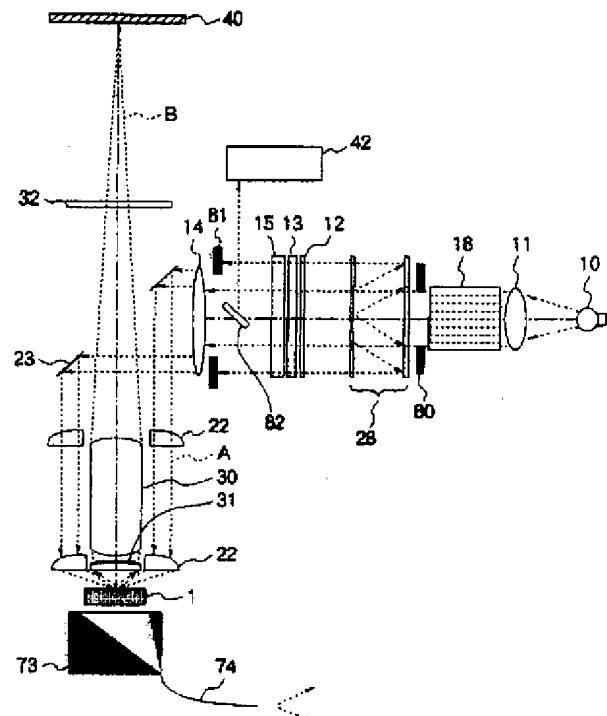
【図6】



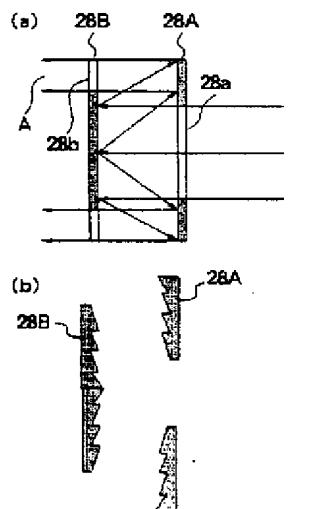
【図7】



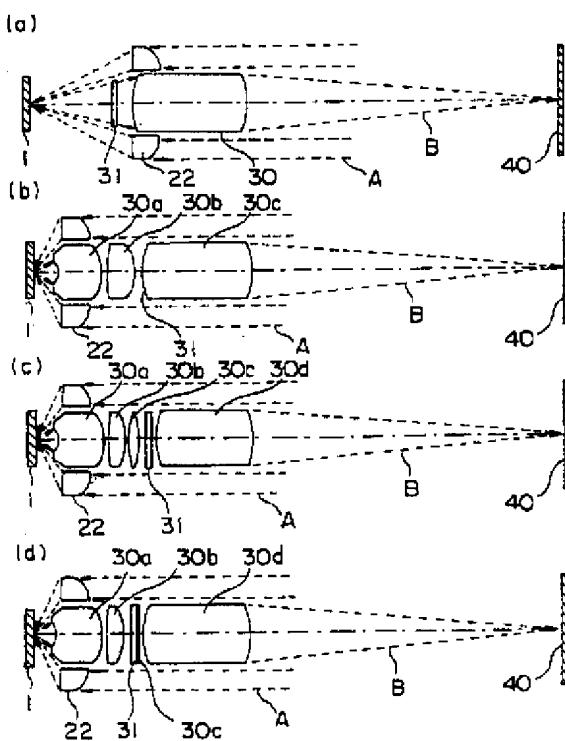
【図8】



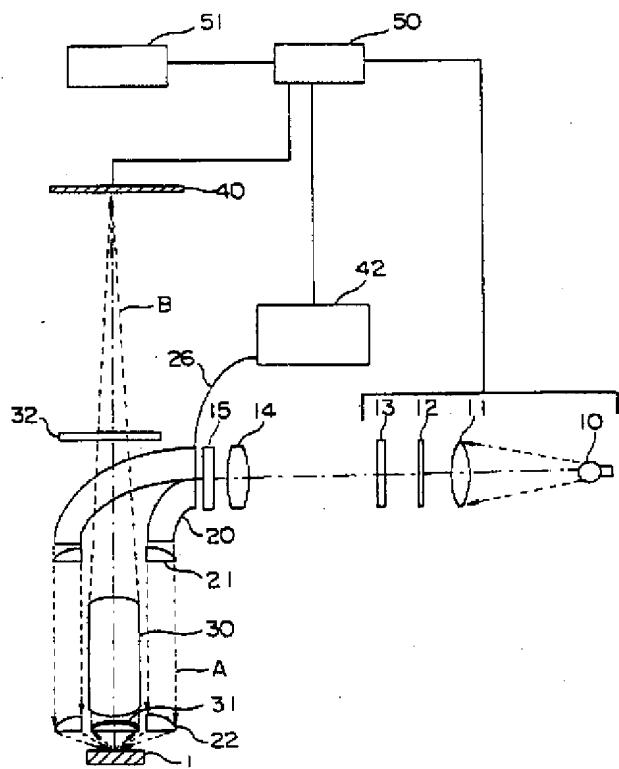
【図9】



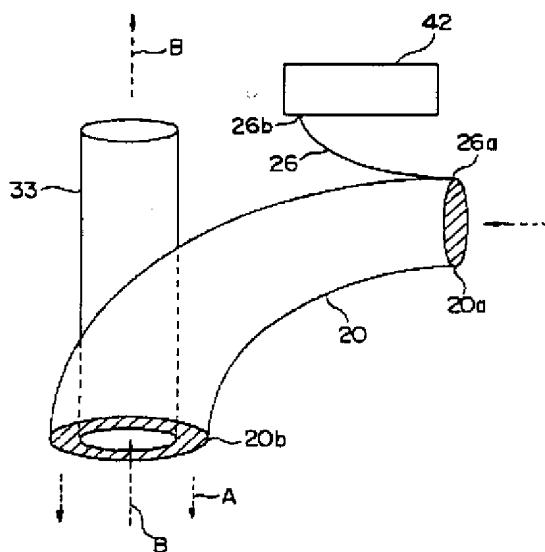
【図10】



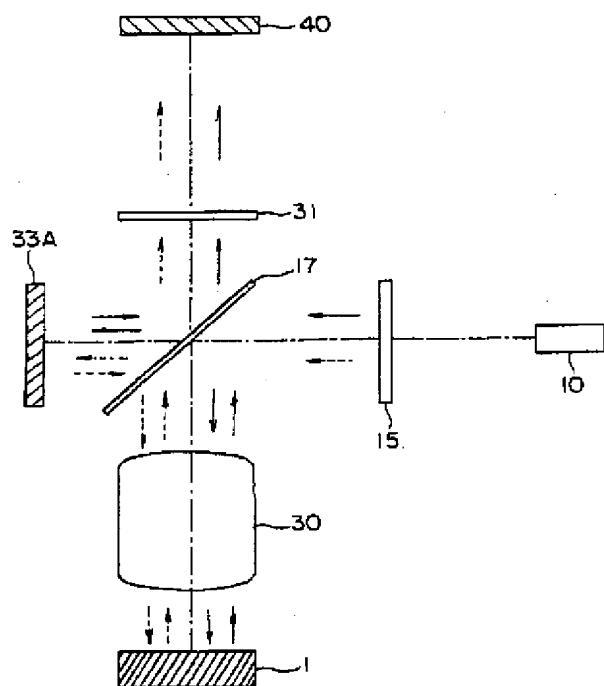
【図11】



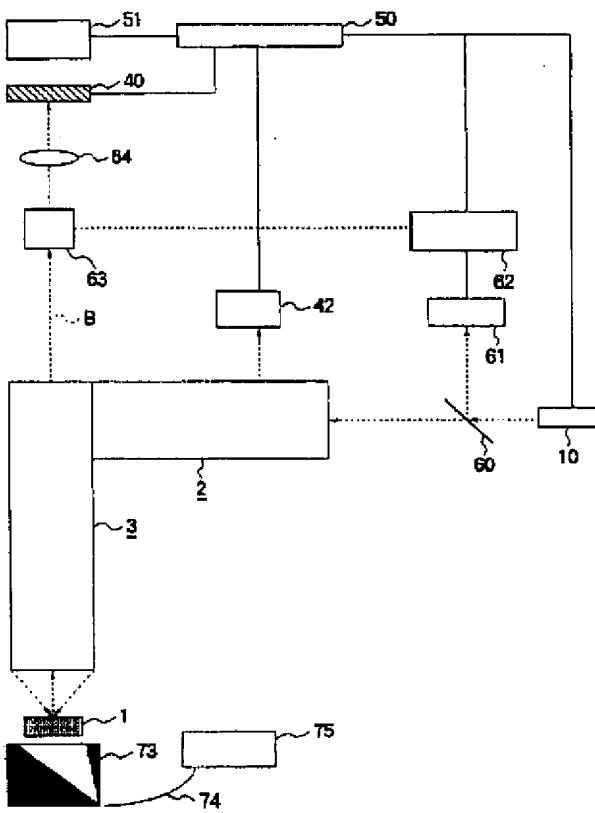
【図12】



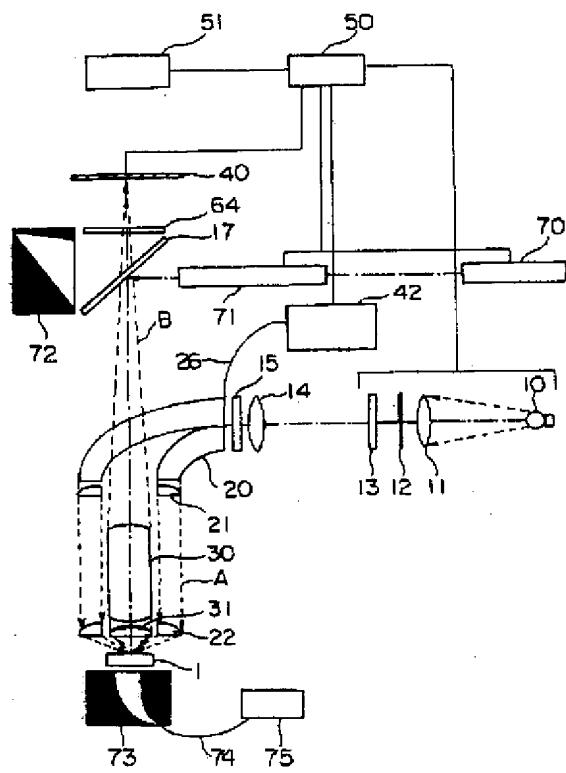
【図17】



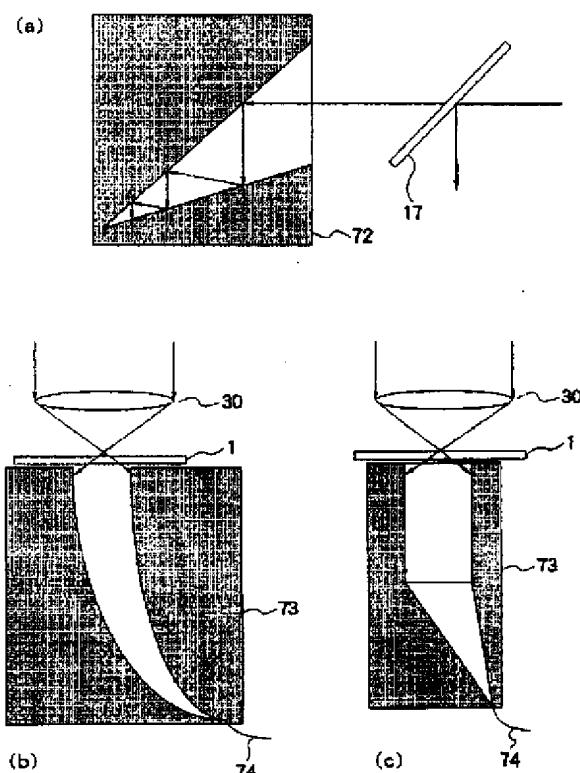
【図13】



[図14]



【図15】



【图16】

